بررسی پروتوکورم‌زایی بدنی ارکیده فالانوپسیس در محیط کشت‌های جامد

آیلار محمدپور باروق[۱]، شیرین دیانتی دیلمی*[۱]، علی فدوی[۲]
[۱]روه باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
[۲]گروه فناوری صنایع غذایی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
*نویسنده مسئول: dianati@ut.ac.ir

چکیده

ارقام مختلف ارکیده فالانوپسیس یکی از پرطرفدارترین ارکیده‌های گلدانی و شاخه بریده موجود در جهان هستند که در سطح تجاری تولید می‌شوند. به‌دلیل عدم امکان تکثیر غیرجنسی این گیاه به شیوه‌های معمول، بالا بودن هزینه‌های تولید و تکثیر نشاء آن به‌دلیل وابسته بودن به سیستم‌های کشت درون شیشه‌ای و استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گران قیمت مانند تیدیازورون برای تولید جنین‌های بدنی، یافتن و معرفی روش‌های ساده و ارزان برای تکثیر غیرجنسی این گیاه، می‌تواند راهکاری ارزشمند و مورد توجه برای تولیدکنندگان تجاری آن باشد که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ریزنمونه‌های پروتوکورمی ارکیده فالانوپسیس در هشت تیمار محیط کشت شامل ۱/۲ اماس (شاهد)، فاست تغییر یافته و محیط‌های ساده کم هزینه دست‌ساز (محیط‌های یک تا شش) در سه تکرار، کشت شدند. سه ماه پس از کشت، صفات مورفولوژی و بیوشیمیایی پروتوکورم‌های رشد یافته شامل وزن تر و خشک، حجم، تعداد و محتوای کربوهیدرات پروتوکورم‌ها ثبت شد. نتایج نشان‌دهنده اثر مثبت استفاده از قندها به‌صورت ترکیبی، روی پروتوکورم-زایی بود. محیط کشت‌های شش و فاست دارای ترکیب قندهای فروکتوز و ساکارز (به‌ترتیب با تولید ۱۳۴ و ۱۳۱ عدد پروتوکورم) با اختلاف معنی‌دار نسبت به سایر محیط‌های کشت، بیشترین مقدار پرتوکورم‌زایی را داشتند. با توجه به کاهش ۷۴ درصدی هزینه‌های کشت در محیط شش، این تیمار به‌عنوان ارزان قیمت‌ترین محیط کشت جامد جهت پروتوکورم‌زایی ارکیده‌های فالانوپسیس بدون نیاز به استفاده از مواد تنظیم کننده رشد، شناخته شد.

واژه‌های کلیدی: تکثیر غیرجنسی، جنین‌زایی بدنی، فروکتوز، محیط کشت ارزان، مواد تنظیم کننده رشد.

مقدمه

فالانوپسیس با ارزش اقتصادی بالا، یکی از محبوب‌ترین ارکیده‌های تک‌پا[۱۰] موجود در بازار جهانی محسوب می‌شود (Naderi *et al*., 2021). یکی از روش‌های تکثیر غیرجنسی این ارکیده، تولید جنین‌های بدنی[۱۱] به‌صورت پروتوکورم‌های شبه بدنی در سیستم کشت درون شیشه‌ای می‌باشد که به‌عنوان بهترین روش تکثیر آن شناخته شده است. به پروتوکورم‌های حاصل از اندام‌هایی به غیر از بذر ارکیده، اندام شبه پروتوکورمی یا پروتوکورم شبه بدنی می‌گویند (da Silva, 2013). در مطالعات صورت گرفته روی انواع مختلف ارکیده، تنها با افزودن مواد تنظیم کننده رشد به محیط‌های کشت، امکان تشکیل این نوع پروتوکورم‌ها فراهم شده است (Hamada *et al*., 2010). تکثیر جنسی و غیرجنسی ارکیده فالانوپسیس تنها در شرایط کشت بافتی امکان پذیر است. محیط‌های کشت متشکل از ترکیباتی از جمله نمک‌های معدنی، ویتامین‌ها، قندها و تا حدی تنظیم کننده‌های رشد هستند که قیمت هر یک از این مواد در صورتی که از شرکت‌های معتبر تهیه شوند، بسیار بالا است و این موضوع سبب افزایش هزینه‌های کشت درون شیشه‌ای جهت تولید تجاری می‌شود (Tyagi *et al*., 2007). گزارش شده است که استفاده از محلول‌های کودی (ان‌پی‌کا[۱۲]) به‌عنوان نمک‌های معدنی به‌دلیل دارا بودن میزان مواد مغذی کم‌تر، جایگزین کردن مواد طبیعی مانند شیر نارگیل، عصاره سیب زمینی و یا پودر موز به‌جای ویتامین‌ها و مواد افزودنی (Romeida *et al*., 2018) و استفاده از عصاره مخمرها و گیاهان مانند شیر نارگیل، عصاره ذرت و پاپایا به‌عنوان جایگزین ارزان قیمت تنظیم کننده‌های رشد (Huh *et al*., 2016)، می‌تواند در کاهش هزینه‌های کشت مؤثر واقع شوند. در این پژوهش سعی

[10]Monopodial
[11]Protocorm- Like Bodies (PLBs)
[12]NPK

شده تا با جایگزین کردن مواد طبیعی و ارزان قیمت به‌عنوان هر یک از مواد تشکیل دهنده محیط‌های کشت، محیط کشتی ارزان قیمت بدون استفاده از مواد تنظیم کننده رشد برای پروتوکورم‌زایی در سطح تجاری، معرفی نمود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ابتدا بذرهای ارکیده فالانوپسیس آمیبیلیس رقم بیجینگ[۱۳] تحت شرایط استریل در محیط نیم غلظت موراشیگ و اسکوگ[۱۴] جامد دارای ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، کشت شدند. سه ماه پس از کشت، محیط‌های کشت جامد شامل نیم غلظت اماس، فاست تغییر یافته و محیط‌های دست‌ساز دارای عناصر اصلی نیتروژن، پتاسیم و فسفر (که با نام محیط‌های یک تا شش مشخص شده‌اند) به‌عنوان تیمارهای آزمایش تهیه شدند (جدول ۱). افزودنی‌ها شامل پودر موز و ذغال فعال به محیط‌های کشت سه تا شش و در نهایت آگار به تمام محیط‌های کشت افزوده شد همه محیط‌ها جهت سترون شدن به‌مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر، قرار گرفتند و با پایین آمدن دمای آن‌ها، هر یک به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر، در ظروف جار ۳۰۰ میلی‌لیتری توزیع شدند. یک هفته بعد از توزیع محیط‌های کشت، پروتوکورم‌های پنج میلی‌متری در هشت تیمار با سه تکرار و هر تکرار دارای پنج عدد ریزنمونه (به وزن ۰/۱ گرم) در قالب طرح کاملا تصادفی، کشت شدند. سپس ظروف کشت شده، به شرایط رشدی داخل اتاقک کشت با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد، طول مدت ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و تحت نور سفید لامپ‌های فلئوروسنت دارای طیف ۴۰۰–۷۰۰ نانومتر و با شدت نور ۲۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه منتقل و به‌مدت سه ماه نگهداری شدند. در مدت سه ماه هر ۳۰ روز یکبار واکشت ریزنمونه‌ها صورت گرفت و سه ماه پس از کشت صفات مورفولوژی از جمله وزن تر و خشک، حجم و تعداد پروتوکورم‌ها و صفات بیوشیمیایی شامل محتوای کربوهیدرات محلول، ذخیره‌ای و کل پروتوکورم، ثبت شد ارزیابی غلظت کربوهیدرات محلول به روش یم و ویلز (Yemm and Willis, 1954) و کربوهیدرات ذخیره‌ای به روش مک کردی و همکاران (McCready *et al*., 1950) با استفاده از ۰/۱ گرم بافت خشک پروتوکورم‌ها انجام شد. سپس جذب نوری آن‌ها به‌ترتیب در طول موج‌های ۶۲۵ و ۶۳۰ نانومتر ثبت و از منحنی استاندارد گلوکز استفاده شد.

[13] *Phalaenopsis amabilis*‘Anthura Beijing’
[14] Murashige and Skoog (MS)

جدول ۱: مقادیر و نوع عناصر مصرفی جهت ساخت محیط کشت‌های جامد دست‌ساز بر حسب میلی‌گرم در لیتر.

مقادیر یونی	محیط یک	محیط دو	محیط سه	محیط چهار	محیط پنج	محیط شش
NH_4^+ NO_3^-	۶۶۶	۱۴/۷۹۱	۶۶۶	۱۴/۷۹۱	۶۶۶	۶۶۶
K^+	۶۶۶	۱۴/۷۹۱	۶۶۶	۱۴/۷۹۱	۶۶۶	۶۶۶
SO_4^{2-}	–	–	–	–	۳۰/۹۲۵	۱/۱۳
$H_2PO_4^-$	۶۶۶	۱۴/۷۹۱	۶۶۶	۱۴/۷۹۱	۶۶۶	۶۶۶
Cl^-	–	–	–	–	۰/۰۵	۰/۰۳
BO_3^{3-}	-	۰/۱۰۵۶۵	-	۰/۱۰۵۶۵	۶/۲	۱
Mn^{2+}	–	۰/۰۲۱۱۳	-	۰/۰۲۱۱۳	۲۲/۳	۰/۱
Zn^{2+}	–	۰/۰۲۱۱۳	–	۰/۰۲۱۱۳	۸/۶	۱
Na^+	–	–	–	–	۳۷/۵	۱۶
MoO_4^{2-}	–	–	–	–	۰/۲۵	–
Cu^{2+}	–	۰/۰۲۱۱۳	–	۰/۰۲۱۱۳	۰/۰۲۵	۰/۰۳
Co^{2+}	–	–	–	–	۰/۰۲۵	–
Ni^+	–	–	–	–	–	۰/۰۳
I^-	–	–	–	–	۰/۸۳	۰/۰۱
Fe^{2+}	–	۰/۱۰۵۶۵	–	۰/۱۰۵۶۵	۳۷	۱۶
پودر موز	–	–	۱۴۲۴۰	۱۴۲۴۰	۱۴۲۴۰	۱۴۲۴۰
ذغال فعال	–	–	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰
ساکارز	۳۰۰۰۰	۳۰۰۰۰	۳۰۰۰۰	۳۰۰۰۰	۳۰۰۰۰	۱۲۰۰۰
فروکتوز	–	–	–	–	–	۵۰۰۰
آگار	۴۸۰۰	۴۸۰۰	۴۸۰۰	۴۸۰۰	۴۸۰۰	۴۸۰۰

نتایج و بحث

نتایج به‌دست آمده از تجزیه آماری داده‌ها در نرم افزار آماری سس نسخه نه[15]، نشان داد که تفاوت بین محیط‌های کشت مختلف در تمامی صفات در سطح احتمال یک درصد، معنی‌دار بوده است (جدول ۲).

جدول ۲: تجزیه واریانس صفات مورفولوژی و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده پروتوکورم‌های رشد یافته در محیط کشت‌های جامد مختلف.

منابع تغییرات		تیمار	خطا	ضریب تغییرات (درصد)
	درجه آزادی	۷	۱۶	–
میانگین مربعات	وزن تر پروتوکورم	۳/۱۴۱۸**	۰/۱۰۵۸	۲۷/۶۵
	وزن خشک پروتوکورم	۰/۰۰۳۶**	۰/۰۰۰۳	۲۸/۷۵
	حجم پروتوکورم	۳/۷۸۴۲**	۰/۰۶۲۴	۱۹/۳۷
	تعداد پروتوکورم	۷۸۴۱/۴۰**	۲۶۶/۱۳	۲۷
	محتوای کربوهیدرات محلول پروتوکورم	۲۱۲/۷۳۹۱**	۱/۹۶۰۸	۶/۰۴
	محتوای کربوهیدرات ذخیره‌ای پروتوکورم	۹۱۴۳/۸۷۷۲**	۸/۰۰۷	۲/۷۸
	محتوای کربوهیدرات کل پروتوکورم	۱۰۴۰۳/۷۷۱۰**	۱۵/۸۳۳۷	۳/۱۸

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و ns غیر معنی‌دار.

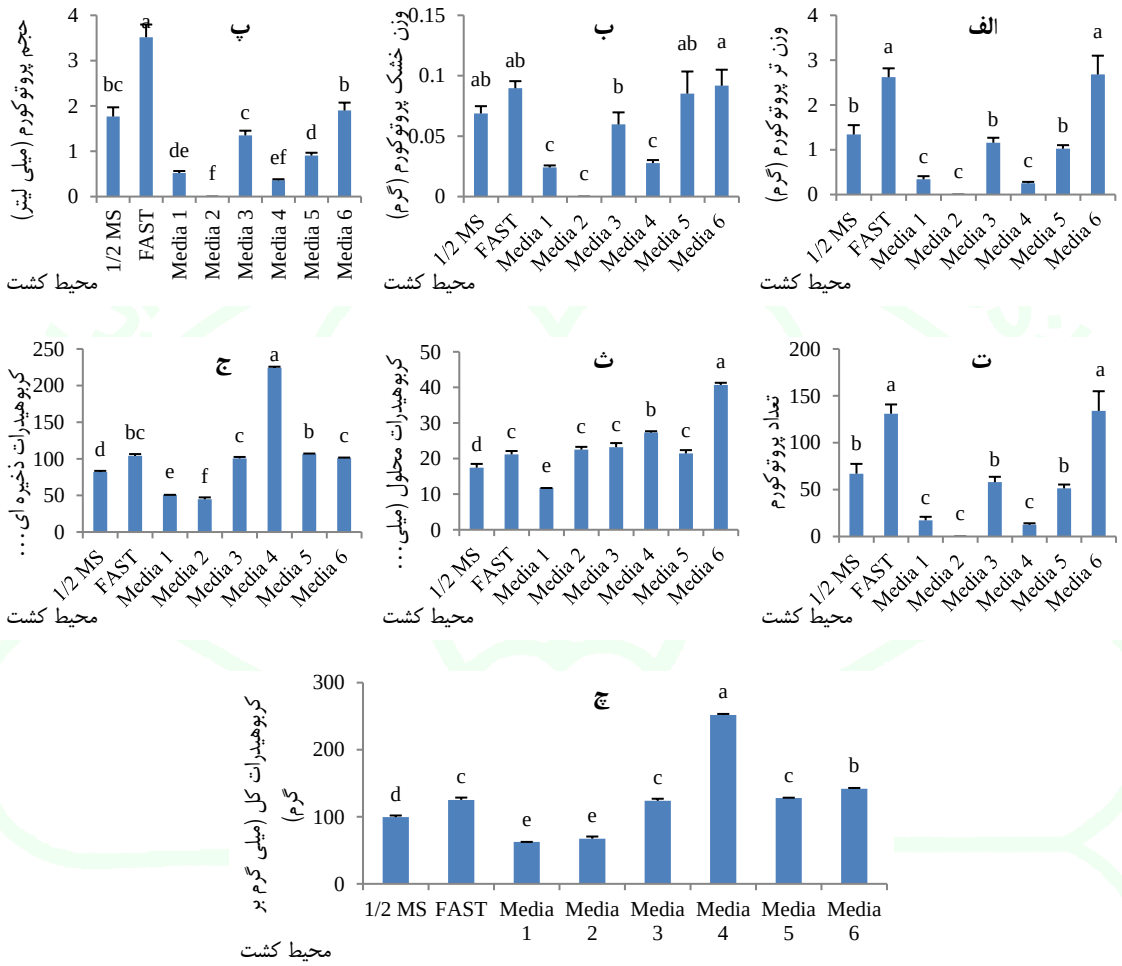
محیط کشت‌های شش و فاست با داشتن به‌ترتیب ۲/۶۸ و ۲/۶۲ گرم وزن تر و ۰/۰۹۲ و ۰/۰۸۹ گرم وزن خشک، بیشترین میزان وزن تر و خشک و محیط دو کمترین میزان این صفات را به خود اختصاص داده است. بیشترین میزان حجم پروتوکورم نیز در محیط

[15] SAS 9.0

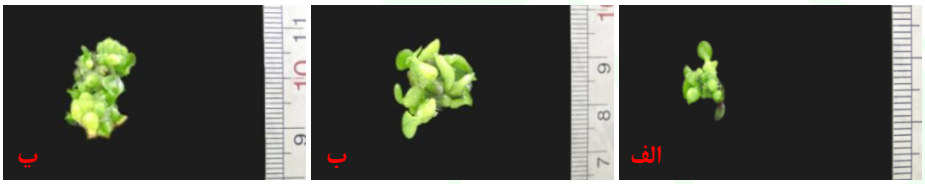
فاست (۳/۵۲ میلی‌لیتر) و شش (۱/۹ میلی‌لیتر) و کمترین آن در محیط دو مشاهده شد. همچنین تعداد پروتوکورم در محیط‌های شش (۱۳۴ عدد) و فاست (۱۳۱ عدد) نسبت به بقیه تیمارها بیشتر و در تیمار دو (صفر عدد) کمتر بوده است (شکل ۱ و ۲). بیشترین محتوای کربوهیدرات محلول در محیط شش (۴۰/۷ میلی‌گرم بر گرم)، کربوهیدرات ذخیره‌ای در محیط چهار (۵۱/ ۲۲۴ میلی‌گرم بر گرم) و کربوهیدرات کل در محیط چهار (۲۵۱/۸۵ میلی‌گرم بر گرم) و شش (۱۴۱/۷۵ میلی‌گرم بر گرم) مشاهده شد (شکل ۱).

ویتامین‌های بی، تیامین، نیکوتینیک اسید، بیوتین و پیرودوکسین، از عوامل محرک پروتوکورم‌زایی هستند و به‌نظر می‌رسد وجود این مواد در این تیمارها سبب تحریک پروتوکورم‌زایی شده است. این ویتامین‌ها علاوه بر محیط‌های شش و فاست در محیط‌های شاهد و پنج نیز وجود دارند، بنابراین طبق گزارش نامبیار و همکاران (2012) که میزان پروتوکورم‌زایی (تعداد، اندازه و وزن تر پروتوکورم) ارکیده دندروبیوم[16]، نخست در محیط نیم غلظت اماس حاوی دو درصد گلوکز سپس حاوی دو درصد فروکتوز و بعد در محیط حاوی دو درصد ساکارز نسبت به بقیه تیمارها بیشتر بوده است، دلیل عمده افزایش پروتوکورم‌زایی در این دو محیط کشت، به‌دلیل وجود قند فروکتوز است. زیرا سرعت هیدرولیز قند ساکارز نسبت به جذب آن در مقایسه با دو قند دیگر سریع‌تر است به همین دلیل تاثیر آن بر پروتوکورم‌زایی نسبت به فروکتوز کمتر می‌شود. همچنین وجود پودر موز و ذغال فعال در محیط شش سبب افزایش وزن تر و خشک پروتوکورم نسبت به تیمار فاست شده است، زیرا موز منبع غنی از پتاسیم، آهن، ویتامین و آمینواسیدها است بنابراین نقش مهمی در تحریک رشد پروتوکورم‌ها ایفا می‌کند. علاوه بر آن وجود قندهای ساده در موز سبب بالارفتن محتوای قند محیط کشت و افزایش وزن پروتوکورم می‌شود. به همین دلیل محتوای کربوهیدرات کل تیمارهای دارای پودر موز (محیط‌های سه تا شش)، از دیگر تیمارها بیشتر بوده است و در محیط چهار نیز وجود تنش به‌دلیل کمبود عناصر ریزمغذی و ویتامین‌ها، باعث شده است که گیاه مقدار کمتری از قند مورد نیاز خود را مصرف و مقدار بالایی از آن را ذخیره کند به همین دلیل بیشترین محتوای کربوهیدرات ذخیره‌ای را به خود اختصاص داده است و بعد از آن در محیط شش به‌دلیل وجود قندهای ساکارز، فروکتوز و همچنین پودر موز، محتوای کربوهیدرات بالا بوده است. همچنین از بین محیط‌های فاقد پودر موز، علت بالا بودن محتوای کربوهیدرات در محیط فاست به‌دلیل وجود قند فروکتوز به همراه ساکارز است. ذغال فعال نیز به‌دلیل قدرت جذب بالا نسبت به ترکیبات زائد و بازدارنده محیط‌های کشت، اثرات منفی احتمالی عصاره موز را خنثی و در پروتوکورم‌زایی تأثیر می‌گذارد. در محیط کشت دو بالا بودن تنش ناشی از کمبود مواد غذایی (عدم وجود یکسری عناصر درشت‌مغذی، ریزمغذی، پودر موز و ذغال فعال) سبب کاهش میزان پروتوکورم‌زایی شده است. یافته‌های حاصل با نتیجه آزمایش آکتر و همکاران (Akter *et al*., 2007) که بیشترین میزان پروتوکروم‌زایی ارکیده دندروبیوم در محیط‌های تجاری و کم هزینه حاوی پوره موز به همراه ذغال فعال اتفاق افتاده است، مطابقت دارد.

[16] Dendrobium Alya Pink



شکل ۱: بررسی صفات مورفولوژی و بیوشیمیایی پروتوکورم‌های رشد یافته در محیط کشت‌های جامد مختلف.



شکل ۲: پروتوکورم‌زایی ریزنمونه‌های کشت شده در محیط‌های کشت الف) نیم غلظت ام‌اس، ب) فاست، پ) شش.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، بیشترین میزان پروتوکورم‌زایی در محیط کشت‌های فاست و شش مشاهده شد که هر دو دارای ترکیب قندهای فروکتوز به همراه ساکارز بودند. بنابراین با توجه به کاهش هزینه‌های کشت درون شیشه‌ای در محیط‌های فاست و شش (به‌ترتیب ۷۰ و ۷۴ درصد) در مقایسه با محیط کشت‌های اماس جامد دارای مواد تنظیم کننده رشد که به‌طور معمول برای این منظور استفاده می‌شوند، استفاده از این دو تیمار کم هزینه جهت پروتوکورم‌زایی و تکثیر ارکیده فالانوپسیس را می‌توان به‌عنوان محیط‌های مناسب برای جایگزینی با محیط‌های کشت پرهزینه اماس دارای مواد تنظیم کننده رشد معرفی و توصیه نمود.

منابع

Akter, S., Nasiruddin, K., Khaldun, A. 2007. Organogenesis of Dendrobium orchid using traditional media and organic extracts. Journal of Agriculture & Rural Development, 30-35.

Da Silva, J.A.T. 2013. Jasmonic acid, but not salicylic acid, improves PLB formation of hybrid Cymbidium. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 22(2): 187-192.

Hamada, K., Shimasaki, K., Ogata, T., Nishimura, Y., Nakamura, K., Oyama-Egawa, H., Yoshida, K. 2010. Effects of spectral composition conversion film and plant growth regulators on proliferation of Cymbidium protocorm like body (PLB) cultured in vitro. Environmental Control in Biology, 48(3): 127-132.

Huh, Y.S., Lee, J.K., Nam, S.Y., Paek, K.Y., Suh, G.U. 2016. Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of Cypripedium macranthos Sw. with organic additives. Journal of Plant Biotechnology, 43(1): 138-145.

McCready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V., Owens, H.S. 1950. Determination of Starch and Amylose in Vegetables. Analytical Chemistry, 22(9): 1156-1158.

Naderi Boldaji, H., Dianati Dylami, Sh., Aliniaeifard, S., Norouzi, M. 2021. Efficient Method for Direct Embryogenesis in Phalaenopsis Orchid. International Journal of Horticultural Science and Technology, 8(1): 37-50.

Nambiar, N., Tee, C.S., Maziah, M. 2012. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocormlike bodies in Dendrobium Alya Pink. Plant OMICS, 5(1): 10-18.

Romeida, A., Supanjani, Sinaga, S.S. 2018. Low-cost media for in vitro multiplication and development of Protocorm like Bodies (PLBs) of Eulophia graminea Orchid. International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology, 8(1): 78-84.

Tyagi, R.K., Agrawal, A., Mahalakshmi, C., Hussain, Z., Tyagi, H. 2007. Low-cost media for in vitro conservation of turmeric (Curcuma longa L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 43(1): 51-58.

Yemm, E., Willis, A. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical journal, 57(3): 508-514.

Investigation of Phalaenopsis Orchid Proliferation Protocorm Like Bodies (PLB) in Solid Culture Media

Aylar Mohammadpour Barough[1], Shirin Dianati Daylami[1*], Ali Fadavi[2]
[1]Department of Horticulture, Aburaihan Campus University of Tehran, Pakdasht, Iran
[2]Department of Food Science Technology, Aburaihan Campus University of Tehran, Pakdasht, Iran
[*]Corresponding Author: dianati@ut.ac.ir

Abstract

Different cultivars of Phalaenopsis orchids are one of the most popular pot and cut flower plants in the world that are produced commercially. Since the asexual propagation of this plant is impossible in the usual ways and seedling propagation of it is expensive due to dependence on in vitro culture systems and the in vitro somatic embryogenesis of it needs expensive growth regulators such as thidiazuron, thus finding and introducing simple and inexpensive methods for asexual propagation of this plant, can be a valuable and important solution for its commercial producers, which was investigated in this study. In this order, protocorms of Phalaenopsis as explants were cultured in eight treatments of culture media including 1/2 MS (control), modified FAST and low-cost simplified culture media (media 1 to 6), in three replications. Three months after cultivation, morphological and biochemical characteristics of grown protocorms were recorded including fresh and dry weight, volume, number and carbohydrate content of protocorms. The results showed that the use of sugars in combination forms had positive effects on protocorm proliferation. Culture media 6 and FAST with combination of fructose and sucrose sugars had the highest amount of protocorms production (134 and 131 protocorms, respectively) with a significant difference compared to other culture media. With regard to 74% reduction in cultivation costs in medium 6, this treatment was recognized as the lowest cost solid culture medium for protocorm proliferation of Phalaenopsis orchids without the need to use of plant growth regulators.

***Keywords*:** Asexual propagation, Fructose, Inexpensive culture medium, Plant growth regulators (PGRs), Somatic embryogenesis.